



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA  
OBTENÇÃO DE MAMOEIRO RESISTENTE À  
MANCHA ANELAR E MELEIRA**

**CAROLINA SENHORINHO RAMALHO**

**MONOGRAFIA DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**Brasília, DF**  
**Dezembro de 2013**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA  
OBTENÇÃO DE MAMOEIRO RESISTENTE À  
MANCHA ANELAR E MELEIRA**

**MONOGRAFIA DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**ORIENTADORES: Prof.<sup>a</sup> NARA OLIVEIRA SILVA SOUZA, Dr. FRANCISCO  
JOSÉ LIMA ARAGÃO, Dra. GLAUCIA BARBOSA CABRAL e Dra. MARIA  
LAINE PENHA TINOCO**

**Brasília, DF  
Dezembro de 2013**

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA  
OBTENÇÃO DE MAMOEIRO RESISTENTE À  
MANCHA ANELAR E MELEIRA**

**CAROLINA SENHORINHO RAMALHO**

Monografia apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília – UnB, como parte das exigências do curso de Graduação em Agronomia, para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

APROVADO POR:

---

Dra. Nara Oliveira Silva Souza  
Doutora, Universidade de Brasília – UnB  
e-mail: [narasouza@unb.br](mailto:narasouza@unb.br)

---

Dr. Francisco José Lima Aragão  
Pós-Doutor, Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
e-mail: [francisco.aragao@embrapa.br](mailto:francisco.aragao@embrapa.br)

---

Dra. Maria Laine Penha Tinoco  
Pós doutora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN  
e-mail: [mlainetinoco@gmail.com](mailto:mlainetinoco@gmail.com)

Brasília, 16 de dezembro de 2013

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ramalho, Carolina Senhorinho

“DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DE MAMOEIRO RESISTENTE À MANCHA ANELAR E MELEIRA”. Orientação: Nara Oliveira Silva Souza, Brasília 2013. 42 páginas.

Monografia de Graduação (G) – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

1. Embriogênese somática 2. Organogênese 3. Transformação genética 4. Regeneração  
5. Cultura in vitro 6. Resistência a herbicida 7. Embrião zigótico imaturo.

I. Souza, N.O.S. II. Dr.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

RAMALHO, C.S. (2013) Desenvolvimento de metodologia para obtenção de mamoeiro resistente à mancha anelar e meleira. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília. 42 páginas. Monografia.

## CESSÃO DE DIREITOS

**Nome do Autor:** CAROLINA SENHORINHO RAMALHO

**Título da Monografia de Conclusão de Curso:** DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DE MAMOEIRO RESISTENTE À MANCHA ANELAR E MELEIRA.

**Ano:** 2013.

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia de graduação e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia de graduação pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor.

CAROLINA SENHORINHO RAMALHO

*Dedico a Deus, por ter me dado forças para chegar até aqui, a minha família e ao meu namorado por terem me apoiado em todos os momentos. Amo muito vocês.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus por tudo, por ser minha fortaleza, a minha salvação, por seu imenso amor e por todas as oportunidades postas em meu caminho.*

*Aos pesquisadores Dr. Francisco J. L. Aragão e a Dra. Glaucia Barbosa Cabral pelos ensinamentos, pelas oportunidades, pelo apoio e contribuição na minha formação como profissional. À Maria Laine Penha Tinoco por me ajudar, aconselhar e me apoiar durante essa caminhada.*

*À professora Dra. Nara Oliveira Silva Souza por todo apoio e auxílio para a realização desse trabalho e conclusão de mais uma etapa.*

*Ao meu pai Alexandre e a minha mãe Roberta Laila pelo amor, pelos cuidados, pelos ensinamentos e por terem apostado em mim. Às minhas irmãs, Ana Luísa, Isabella Cristina e Marina, pelo amor e por deixar as coisas mais felizes. Ao meu namorado, Pedro Henrique Luna, pelo companherismo, pela ajuda, pela paciência, pelo carinho e cuidado comigo.*

*À toda a minha família, as minhas avós, aos meus tios e primos, pelo amor, compreensão e carinho.*

*A todos amigos de curso pela a oportunidade de estudarmos e aprendermos juntos, em especial à Flávia Zanchett, ao Victor Oliveira, ao Luiz Felipe Cassol, à Deborah Mesquita, ao Silas Dutra e à Patrícia Costa, pela amizade, pela ajuda, pelos incentivos, e por terem tornado as coisas mais divertidas.*

*Aos meus colegas e amigos que fiz no Laboratório de Engenharia Genética Aplicada a Agricultura Tropical: Elsa, Glaucia, Maria Laine, Francielle Boff, Pedro, Lídia, Patrícia, Cristiane Citadin, Cristiana Andrade, Thaís, Mirella, Angélica, Felipe, Francielle, Leonardo, Rebeca, Ana Zotta, Abdul e Pabline pela amizade, ajuda e aprendizado proporcionado.*

*Aos colegas e amigos que conheci na Embrapa, que fizeram parte dessa etapa: Emanuel Abreu, Camila Chabi, Helen Carolina, Juliana, Cristina, Rebeca e Letícia por toda ajuda e apoio.*

*A todos os professores da graduação, pelos ensinamentos e pela contribuição para minha formação como profissional e como pessoa.*

*A todos meus amigos por sempre me apoiarem em todos os momentos.*

*E àqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.*

*Muito obrigada!*

## RESUMO

### DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DE MAMOEIRO RESISTENTE À MANCHA ANELAR E MELEIRA

Mamão (*Carica Papaya* L.) é uma frutífera cultivada em regiões tropicais e subtropicais, conhecida pelos seus benefícios nutricionais e pela aplicação medicinal da papaína que é uma enzima proteolítica valiosa. As viroses constituem um dos principais fatores limitantes para a expansão da cultura, com destaque para o vírus da mancha anelar (*Papaya ringspot virus*, PRSV) e o vírus da meleira (Papaya meleira vírus, PMeV). A utilização da técnica de silenciamento gênico por RNA interferente (RNAi) é uma estratégia viável para a obtenção de mamoeiro resistente a múltiplas viroses (PRSV e PMeV). Os objetivos desse trabalho foram o desenvolvimento de metodologia para obtenção de linhagens de mamoeiros resistentes aos vírus (PRSV e PMeV) utilizando a estratégia de RNAi. Para tal, embriões zigóticos da variedade Sunrise Solo foram cultivados em meio MS suplementado com 2,4- D para indução de embriogênese somática, e em meio MS suplementado com TDZ para indução de organogênese. Ambos explantes induzidos foram bombardeados com o plasmídeo pAPRNAi2, que contém o cassete de RNAi para os dois vírus. A seleção das células embriogênicas e organogênicas transformadas por biobalística foi realizada por subcultivos sucessivos em meio contendo o herbicida glifosinato de amônio (GA), que resultou em embriões somáticos e brotos resistentes. A análise da expressão da enzima PAT (Phosphinotricina Acetil Transferase) pelo imuno teste de fluxo lateral confirmou a natureza transgênica do material bombardeado resistente ao GA. Embriões somáticos resistentes foram regenerados em meio de maturação e germinação, sem o agente seletivo, e após o enraizamento as plântulas foram aclimatadas. Enquanto que os brotos resistentes a glifosinato estão sendo induzidos para enraizamento e serão futuramente aclimatados em casa de vegetação. Ambas as estratégias foram viáveis para introdução de genes exógenos em células de mamoeiro.

**Palavras-chave:** Embriogênese somática, organogênese, transformação genética, regeneração, cultura in vitro, resistência a herbicida, embrião zigótico imaturo.

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Estádios de desenvolvimento do fruto, sementes e embrião zigótico de mamão utilizado para indução de embriogênese somática.	24
2	Representação esquemática do vetor pAPRNAi2 que contém as construções de RNAi para sequências específicas dos vírus PRSV e PMeV, e o gene <i>bar</i> , que confere resistência ao herbicida glifosinato de amônio (GA) e codifica para a enzima Phosphinotricina Acetil Transferase (PAT).	26
3	Indução de embriogênese somática em embrião zigótico imaturo.	29
4	Indução de embriogênese somática secundária a partir de embriões somáticos primários macerados da cv. Sunrise Solo.	30
5	Efeito de sucessivas macerações para indução de embriogênese somática secundária na presença de 2,4-D.	31
6	Maturação e germinação de embriões somáticos da cv. Sunrise Solo.	32
7	Imunoensaio de fluxo lateral das plantas regeneradas e aclimatadas, obtidas por embriogênese somática e por transformação via biobalística.	33



<b>8</b>	Indução de organogênese e regeneração de brotos transgênicos a partir de embrião zigótico imaturo da cv. Sunrise Solo.	34
<b>9</b>	Detalhe do Imunoensaio de fluxo lateral para a proteína PAT de brotos resistentes ao GA subcultivados em meio de brotação.	35

---

## LISTA DE ABREVIACÕES

AIA = ácido indolacético;

AIB = ácido indolbutírico;

ANA = ácido 1-naftalenoacético;

BAG = banco de germoplasma;

BAP = benzinopurina;

CaCl<sub>2</sub>: cloreto de cálcio;

DNA = ácido desoxirribonucleico;

dsRNA = RNA fita-dupla;

ES: embriogênese somática;

G.A: glifosinato de amônio;

GA3 = ácido giberélico;

miRNA = microRNA;

MS: Murashige e Skoog (1962);

NaCl: hipoclorito de sódio;

PAT: Phosphinotricina Acetil Transferase;

pb = pares de bases;

PBS: Tampão comercial;

PMeV: Papaya meleira vírus;

PRSV: *Papaya ringspot virus*;

RNA = Ácido ribonucleico;

RNAi = RNA interferente;

SGPTS = Silenciamento Gênico Pós-Transcricional;

siRNA = pequenos RNAs interferentes;

TDZ = thiadizuron;

2,4-D: ácido diclorofenoxiacético.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1. Aspectos gerais da cultura <i>Carica papaya</i> L.....	16
3.2. Importância econômica e social .....	16
3.3. Principais problemas na produção do mamoeiro - viroses.....	17
3.4. Melhoramento genético do mamoeiro.....	19
3.5. Embriogênese somática.....	20
3.6. Organogênese .....	21
3.7. Transformação genética por biobalística.....	21
3.8. RNA interferente .....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1. Material vegetal.....	24
4.2. Desinfestação dos frutos e sementes .....	24
4.3. Indução de embriogênese somática.....	25
4.4. Indução de organogênese .....	25
4.5. Transforamação genética.....	25
4.5.1 Vetor.....	25
4.5.2 Bombardeamento de massa embriogênica .....	26
4.5.3 Bombardeamento de embriões zigóticos induzidos em TDZ .....	27
4.6. Regeneração de explantes transformados.....	27
4.6.1 De embriões somáticos (Maturação, Germinação e Aclimação) .....	27
4.6.2 De brotos induzidos em TDZ .....	28
4.7. Ensaio de fluxo lateral da proteína PAT .....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
5.1. Embriogênese somática .....	29
5.1.1 Indução de embriogênese somática .....	29
5.1.2. Regeneração de embriões somáticos após o bombardeamento.....	31
5.2. Organogênese .....	33
5.2.1 Indução de organogênese .....	33
5.2.2 Regeneração de brotos após bombardeamento .....	33

6.	CONCLUSÕES .....	36
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	37

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas (FAOSTAT, 2013) e o segundo maior produtor mundial de mamão (*Carica Papaya* L.), perdendo somente para a Índia (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2013). Em nível nacional, temos como grandes destaques o estado da Bahia, responsável por 45% da produção nacional de mamão, seguido pelo Espírito Santo responsável por 32% da produção brasileira (IBGE/PAM, 2012).

*Carica Papaya* L. pertence à família Caricaceae e é uma árvore frutífera cultivada em regiões tropicais e subtropicais (RAMASWAMY *et al.*, 2010) de rápido crescimento, capaz de produzir durante o ano todo (MURAYAMA, 1986). Essa cultura tem uma grande importância social e elevada expressão econômica (MURAYAMA, 1986), conhecida por seus benefícios nutricionais e variáveis aplicações medicinais (MALABADI *et al.*, 2011).

Os principais problemas que afetam a cultura do mamoeiro decorrem de sua susceptibilidade a pragas e doenças (OLIVEIRA *et al.*, 1996), principalmente às viroses que causam grandes perdas na produção (LIMA *et al.*, 2001). Os vírus causadores da mancha anelar (*Papaya ringspot virus* - PRSV) e causador da meleira (*Papaya meleira virus* - PMeV) constituem um dos maiores entraves para a produção e implantação de novos pólos produtores (DANTAS & MORALES, 1996).

Fontes de resistência genética natural no germoplasma de *Carica papaya* ainda são desconhecidas, e os híbridos interespecíficos são estéreis e inviáveis agronomicamente (VILARINHOS *et al.*, 1996). Ferramentas biotecnológicas estão sendo utilizadas para favorecer o melhoramento genético do mamoeiro; dentre elas a transformação genética via biobalística vem sendo utilizada para o desenvolvimento de variedades resistentes a viroses (OLIVEIRA *et al.*, 1996).

Em 1985 começaram a ser feitas pesquisas para o desenvolvimento de mamoeiro geneticamente modificado com resistência ao vírus PRSV, e em 1991 foi desenvolvida a primeira linhagem de mamoeiro transgênico, denominada de 55-1, que foi usada para criar as cultivares SunUp e Rainbow resistentes ao PRSV, que foram liberados comercialmente em 1998. Em 2010 mais de 70 % da área voltada para o cultivo do mamoeiro foi destinado para o plantio das cultivares transgênicas, que estão sendo

cultivadas e consumidas no Havaí, nos países do Estados Unidos, no Canadá, e atualmente no Japão (GONSALVES *et al.*, 2010, GONSALVES *et al.*, 2004).

As cultivares Rainbow e SunUp, resistentes ao PRSV com proteção mediada pelo gene da capa protéica (cp), foram eficientes no Havaí, embora em outras regiões a resistência não foi eficiente e plantas foram susceptíveis, devido à alta especificidade dos isolados do PRSV (GONSALVES *et al.*, 2004). O silenciamento gênico pós-transcricional via RNA interferente é uma estratégia viável para a produção de plantas resistente à vírus (ARAGÃO *et al.*, 2013), devido a degradação de sequências específicas do RNA viral (DOUGHERT & PARKS, 1995).

## **2. OBJETIVOS**

Os objetivos deste trabalho foram o desenvolvimento de novo protocolo para obtenção de linhagens de mamoeiro resistentes aos vírus, PRSV e PMeV, via RNA interferente (RNAi), por meio de transformação genética via biobalística, utilizando os sistemas de embriogênese somática e organogênese.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Aspectos gerais da cultura *Carica papaya* L.

O mamoeiro pertence ao grupo das Angiospermas, Classe Dicotyledoneae, Ordem Violales, Família Caricaceae, que é dividida em seis gêneros, com 35 espécies. A espécie *Carica papaya* L. é a mais importante comercialmente, pertencente ao gênero *Carica*, que tem seu centro de origem na América Central ao Noroeste da América do Sul, apresentando maior diversidade no México e na Bacia Amazônica Superior (PEREIRA, *et al.*, 2009).

*Carica papaya* L. é uma planta típica de regiões tropicais e subtropicais, que apresenta rápido crescimento, com produção de frutos a partir de oito a dez meses após o transplante para o campo (YEH & GOLSALVES, 1994), com o pico de produção entre três a cinco anos (MARIN & SILVA, 1996).

O sistema radicular é pivotante e o caule, geralmente, é cilíndrico, único, sem ramificações, verde, com cicatrizes proeminentes deixadas pelas folhas, que são palmilobadas, longamente pecioladas e possuem nervuras salientes. Os frutos são bagas, com variação no tamanho e na cor da polpa, que podem ser amareladas, alaranjadas ou avermelhadas, e no seu interior encontram inúmeras sementes, rugosas cobertas com sarcotesta e uma capa interna escura, chamada de esclerotesta, também conhecida como endotesta (MANICA, 1982).

As inflorescências do mamoeiro podem apresentar flores femininas, masculinas e hermafroditas, e os frutos possuem uma forma característica para cada tipo de flor, em que a hermafrodita é mais desejada para a produção de frutos comerciais.

#### 3.2 Importância econômica e social

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas, com produção aproximada de 38.793 mil toneladas em 2010 (FAOSTAT, 2013). A fruticultura brasileira é uma atividade promissora devido às condições edafo-climáticas favoráveis e a disponibilidade de áreas agricultáveis, que pode ser potencializado pelo aumento de tecnologias de produção, que possibilitam o aumento de produtividade e competitividade (LIMA *et al.*, 2001).

O mamão (*Carica papaya* L.) é uma cultura com importância social e econômica, conhecida por seus benefícios nutricionais e variáveis aplicações medicinais



(MALABADI *et al.*, 2011). A fruta é rica em vitamina A, vitamina C, potássio, folato, niacina, tiamina, riboflavina, ferro e cálcio. Os frutos, caules, raízes e folhas são utilizados em variáveis aplicações médicas, inclusive para a produção de papaína, que é uma enzima proteolítica valiosa (MING *et al.*, 2008).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial, após a Índia (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2013). Segundo dados coletados pelo IBGE a produção anual brasileira de mamão no ano de 2012 foi de 1.517.696 toneladas, com 32.901 hectares destinados ao plantio. O Brasil é um dos principais produtores de mamão, com destaque para a região Nordeste que representou 60,45% da quantidade produzida, seguida pelo Sudeste (36,202%), Norte (2,74%), Centro Oeste (0,369%) e Sul (0,235%).

Os estados da Bahia e Espírito Santo são responsáveis por 77% da produção total brasileira, sendo a Bahia responsável por 45% e o Espírito Santo por 32% (IBGE/PAM, 2012).

### **3.3 Principais problemas na produção do mamoeiro- viroses**

Diversos fatores têm limitado o desenvolvimento da cultura do mamoeiro, como sua natureza dióica, heterozigose e problemas fitossanitários (ABREU *et al.*, 2011).

Problemas relacionados às doenças e pragas são os principais fatores que limitam o desenvolvimento da cultura, com destaque para viroses, que podem causar grandes danos econômicos com perda na qualidade dos frutos e redução na produtividade, até a completa destruição da lavoura, inviabilizando o cultivo em algumas áreas (REZENDE & FACELLI, 1997).

Os principais vírus que infectam o mamoeiro no Brasil são o vírus da mancha anelar (*Papaya ringspot virus*, PRSV) e o vírus da meleira (*Papaya meleira virus*, PMeV). O PRSV é a doença de maior importância econômica e de maior distribuição geográfica, com a primeira ocorrência relatada no Havaí, mas já registrada em vários países tropicais e sub-tropicais em que o mamoeiro é cultivado, inclusive nos territórios brasileiros (NAKASONE, 1980).

No Brasil, o primeiro relato da doença foi feito em São Paulo no ano de 1969 (COSTA *et al.*, 1969) e no Nordeste a identificação do vírus se deu na década de 70 (LIMA & GOMES, 1975). O vírus causa danos econômicos em várias regiões, sendo

que em algumas regiões o cultivo do mamão já se tornou inviável devido a infestações severas.

O vírus PRSV pertence à família *Potyviridae* do gênero *Potyvirus* (PURCIFULL *et al.*, 1984a), suas partículas são alongadas e flexuosas medindo 780 x 12 nm e seu genoma é composto por RNA de senso positivo (YEH *et al.*, 1992). O PRSV está classificado em dois biótipos, o W que infecta somente as Curcubitáceas (OLIVEIRA *et al.*, 2000), e o P que infecta as espécies das famílias Curcubitaceae e Caricaceae, impactando na produção de mamão (BATESON *et al.*, 1994).

A transmissão do vírus se dá mecanicamente ou por afídeos, que transmitem o vírus de forma não persistente durante as picadas de prova (PURCIFULL *et al.*, 1984a; BARBOSA & PAGUIO, 1982). Mudas infectadas são veículos de introdução e disseminação da doença em áreas indenizadas (LIMA *et al.*, 2001).

Os mamoeiros infectados apresentam sintomas de mosaico, distorção foliar, manchas oleosas em forma de anéis com centro verde e cor amarela ao redor. Nos frutos, pecíolos e caule também apresentam manchas que podem ser mais alongadas e/ou circulares (LIMA *et al.*, 2001).

O vírus da meleira é atualmente considerado um importante problema fitossanitário para a cultura do mamão no Brasil, principalmente no Norte do Espírito Santo e no Sul da Bahia, podendo atingir até 100% de incidência se não forem feitas as medidas de prevenção e contenção necessárias (VENTURA, *et al.*, 2003).

O primeiro relato da meleira se deu na Bahia (CORREA *et al.*, 1988) e após no Espírito Santo (RODRIGUES *et al.*, 1989a; 1989b), mas a doença tem sido detectada em alguns municípios dos estados de Minas Gerais, Ceará, Pernambuco e Rio Grande do Norte (VENTURA *et al.*, 2003).

Inicialmente os sintomas da doença foram associados a distúrbios na absorção de cálcio e boro, relacionados ao estresse hídrico (NAKAGAWA *et al.*, 1987) ou desbalanceamento de bases trocáveis no solo (CORREA *et al.*, 1988).

Posteriormente Kitajima *et al.* (1993) detectaram a presença de partículas virais e de fitas duplas de RNA no látex de mamoeiros com sintomas, o que indicou sua natureza virótica. Zambolim e colaboradores (2000) comprovaram a etiologia viral da doença após conseguir reproduzir os sintomas em plantas saudáveis após a inoculação do vírus.

Os principais sintomas de plantas infectadas caracterizam-se pela intensa exsudação de látex nos frutos, os quais escurecem devido à oxidação e assumem um aspecto "melado". Outros sintomas são também visualizados como manchas zonadas verde-claras e má formação dos frutos, que depreciam a qualidade e o valor comercial dos frutos (LIMA *et al.*, 2001).

Algumas medidas de controle podem ser tomadas visando reduzir as perdas, mas de forma geral o controle ainda é complicado e dispendioso. Estratégias como o uso de mudas certificadas sadias, plantio em locais livres do vírus, erradicação de fontes do vírus e controle do inseto vetor devem ser tomadas na tentativa de reduzir as infestações e consequentemente, as perdas (LIMA *et al.*, 2001).

### **3.4 Melhoria genética do mamoeiro**

Os programas de melhoramento genético do mamoeiro buscam qualidade dos frutos e produtividade por hectare, para suprir as exigências dos mercados internos e externos. Dentre as características agrônomicas desejáveis buscam linhagens vigorosas, com alta produção, resistente às doenças, tolerante aos ataques de pragas, hermafroditas, precoces, com maturação dos frutos uniforme, com uma cobertura abundante que permita boa capacidade fotossintética, com tronco firme que suporte a carga dos frutos, sem ramificações laterais e com porte baixo para facilitar a colheita (MANICA, 1996).

Para a análise de qualidade dos frutos leva-se em consideração o tamanho, formato, casca, cor, sabor, a quantidade de papaína, látex e teor de brix, em que as características desejáveis variam de acordo com a finalidade e a demanda de mercado. De modo geral os consumidores da fruta in natura preferem frutos provenientes de flores hermafroditas que possuem um formato mais alongado e cilíndrico, com polpa firme, macia, de coloração alaranjada, com sabor doce e menor quantidade de papaína, que não é desejável para o consumo da fruta in natura, e sim para fins industriais (MANICA, 1996).

As cultivares mais importantes comercialmente pertencem ao grupo Solo e ao Formosa. As variedades do grupo Solo possuem frutos menores e são preferidos para exportação com predomínio da variedade Sunrise Solo e Golden, e as do grupo Formosa, são híbridos com tamanho médios com destaques para Tainung n° 1, Tainung n° 2 e Caliman 01 (PEREIRA *et al.*, 2009).

Um dos focos do melhoramento genético do mamão é a produção de plantas resistentes à viroses, por serem um dos principais fatores limitantes para a cultura. Diferentes estratégias têm sido utilizadas, sem sucesso, para o controle destas viroses. Os programas de melhoramento têm buscado genes que induzam resistência do tipo imunidade ou tolerância a esses vírus, mas a resistência natural de mamoeiro ao PRSV e PMV não têm sido identificada em *Carica papaya* e no germoplasma existente, dificultando a transferência por cruzamentos, que também encontram problemas relacionados à incompatibilidade e produção de plantas estéreis (MAGDALITA *et al.*, 1997).

As técnicas de biotecnologia estão sendo utilizadas como ferramentas importantes no melhoramento genético do mamoeiro, dentre as quais, a cultura de tecidos, cultivo in vitro, a micropropagação, a transformação genética via biobalística e *Agrobacterium*, e as análises moleculares, estão sendo utilizadas para o desenvolvimento de variedades resistentes (OLIVEIRA *et al.*, 1996).

### 3.5 Embriogênese somática

Embriões somáticos são provenientes de células embriogênicas que apresentam uma totipotencialidade, ou seja, que possuem um potencial necessário para a formação de uma planta completa (ZIMMERMANN, 2010).

A embriogênese somática é um dos procedimentos utilizados na cultura de tecidos, que permite a reprodução massiva, utilizado como um sistema alternativo e competitivo para multiplicação e manutenção em larga escala de plântulas de *C. papaya* com características de grande interesse agrônomo (FITCH, 1993). Esse sistema também é utilizado para produzir explantes utilizados na transformação genética devido à sua capacidade de gerar novas plantas (TORRES *et al.*, 2000).

A indução de embriões somáticos pode ser dada, a partir de vários tecidos e órgãos das plantas, com potenciais morfogênicos diferentes, que são afetados por diversos fatores, tais como a idade dos explantes, a concentração do agente estimulante, luz e temperatura (BONGA, 1982).

Posteriormente embriões formados passam do estágio globular, para os estádios de torpedo e coração. Na fase de torpedo inicia-se o amadurecimento, que posteriormente resultará em embriões no estágio cotiledonar, que germinarão e darão origem a uma plântula (AMMIRATO, 1983).

O principal regulador utilizado para a indução de embriões somáticos é o ácido 2,4 – diclorofenoxiacético (2,4 - D), que leva ao aumento dos níveis endógenos do ácido indolacético, que é uma auxina (PASTERNAK et al., 2002) essencial para a formação de massas celulares proembriônicas e para a transição do estágio globular para o coração (ZIMMERMANN, 2010).

### **3.6 Organogênese**

Na organogênese, células e tecidos vegetais diferenciam-se para formar órgãos com funções distintas da que estavam anteriormente submetidas, que após são chamados de adventícios. Com o cultivo *in vitro* é possível induzir a formação de novos órgãos vegetais, como brotos e raízes, com a manipulação de nutrientes e de reguladores de crescimento, em condições controladas de luz e de temperatura (LEMOS, 2010).

Em várias espécies foram testadas a organogênese *in vitro*, mas o fenômeno não pode ser considerado universal. As células capazes de rediferenciar em resposta a um estímulo são chamadas de competentes, pois possuem a capacidade de se dividirem e seguir um caminho novo de desenvolvimento. Células íntegras com o núcleo conservado, podem retornar às condições de células tronco desdiferenciadas ou meristemáticas, em resposta a determinados estímulos. Os meristemas por serem zonas de intensa divisão celular são considerados morfogeneticamente responsivos e por isso são utilizados para obtenção de gemas (LEMOS, 2010).

A organogênese pode ser direta, com a formação de células diferenciadas diretamente de algum tecido vegetal, ou podem ser indiretas, com formação a partir da proliferação de calos. É comum ter a ocorrência dos tipos de organogênese simultaneamente, dificultando a distinção das duas (LEMOS, 2010).

Os hormônios de crescimento são os principais indutores dos estímulos para a organogênese. A formação de brotos e raízes pode ser regulada pela relação da auxina e citocinina como observado no trabalho de Skoog e Miller (1957). O tidiazuron (TDZ) pode ser utilizado para a formação de calos e brotos, com atuação ambígua, por agir, tanto como uma auxina, como uma citocinina (SINGH *et al.*, 2003).

### **3.7 Transformação genética por biobalística**

O processo de biobalística consiste na aceleração de micropartículas cobertas por DNA, RNA ou proteínas, que atravessam a parede celular e a membrana plasmática de

forma não letal (SANFORD *et al.*, 1987). Essa técnica foi desenvolvida inicialmente por Klein *et al.*, (1987) e Sanford *et al.*, (1987), como uma alternativa para a introdução direta do material genético no genoma (ARAGÃO & BRASILEIRO, 2010).

Os sistemas utilizados para o bombardeamento baseiam-se na formação de ondas de choque, que gerem energia suficiente para o deslocamento das micropartículas envolvidas pelos ácidos nucleicos desejados para a incorporação de células do tecido alvo (ARAGÃO *et al.*, 1996; RECH *et al.*, 2008). Diversos sistemas são utilizados no processo de aceleração, em que os de alta pressão de gás hélio e de descargas elétricas são os mais utilizados, por serem mais eficientes e permitir maiores frequências de transformação (ARAGÃO & BRASILEIRO, 2010).

As partículas utilizadas precisam ter alta densidade, tamanho e formato adequados, que não degradem e não destruam os ácidos nucleicos. Partículas de ouro e de tungstênio podem ser utilizadas, entretanto o mais comum é o uso de partículas de tungstênio, embora com qualidade menor em relação às de ouro apresentaram um custo reduzido (ARAGÃO & BRASILEIRO, 2010).

O bombardeamento é feito em uma câmara de vácuo para reduzir perdas na aceleração pelo atrito com o ar (VILARINHOS *et al.*, 1996). A umidade relativa na hora da precipitação das micropartículas na membrana carreadora deve ser baixa (SMITH *et al.*, 1992) para evitar a formação de aglomerados de partículas grandes que também podem ser causadas pelo excesso de DNA ou presença de impurezas na solução (ARAGÃO *et al.*, 1993; KLEIN *et al.*, 1988).

A ferramenta de biobalística pode ser utilizada como uma alternativa na busca de plantas resistentes às viroses, principalmente para o PRSV, em que métodos de melhoramento convencional não foram bem sucedidos, devido à falta de diversidade natural de resistência e problemas relacionados à incompatibilidade e esterilidade (LIMA *et al.*, 2001).

Em 1985 começaram a ser feitas pesquisas para o desenvolvimento de mamoeiro geneticamente modificado com resistência ao vírus PRSV, que causa a doença de maior importância do mamoeiro e de maior disseminação geográfica (GONSALVES *et al.*, 2010). Nos trabalhos realizados por Fitch *et al.* (1990); Gonsalves *et al.* (1999), Gonsalves *et al.* (1998) e Cai *et al.* (1999) foram utilizadas as ferramentas de biobalística para a obtenção de plantas resistentes ao vírus da mancha anelar.

Em 1991 foi desenvolvida uma linhagem de mamoeiro transgênico, denominada de 55-1, com resistência ao PRSV que após foi testada em campo. A linhagem de mamoeiro 55-1 foi usada para criar as cultivares resistentes, SunUp e Rainbow, que foram liberados comercialmente em 1998, e em 2010 mais de 70 % da área voltada para o cultivo do mamoeiro foi destinado para o plantio das cultivares transgênicas (GONSALVES *et al.*, 2010).

Rainbow e SunUp têm sido comercialmente cultivados e consumidos no Havaí, nos países do Estados Unidos, no Canadá, que aprovou a importação do mamão transgênico em 2003, e no Japão que recentemente liberou a comercialização. Apesar dos resultados satisfatórios da resistência ao PRSV para vários isolados no Havaí, em outras regiões a resistência não foi eficiente e plantas foram susceptíveis devido à alta especificidade dos isolados do PRSV (GONSALVES *et al.*, 2004). A resistência mediada pelo RNA interferente tem grande potencial para a produção de plantas resistentes à viroses (PRINS, 2003; RITZENTHALER, 2005; BONFIM *et al.*, 2007), devido a degradação de sequências específicas do RNA viral (DOUGHERT & PARKS, 1995).

### 3.8 RNA interferente

O Silenciamento gênico pós-transcricional ou RNA interferente é umas das estratégias da engenharia genética, que pode ser utilizada na busca de obter plantas resistentes às viroses, que sejam capazes de suprimir a expressão de genes endógenos e ácidos nucleicos invasores (ARAGÃO *et al.*, 2013). A técnica de RNAi também pode ser utilizada na busca de plantas resistentes e/ou tolerantes à outras doenças e pragas (WANG *et al.*, 2000; BONFIM *et al.*, 2007) e para obtenção de plantas com melhor valor nutricional ou para maior aproveitamento de matérias-primas para uso industrial (OSSOWSKI *et al.*, 2008; SUNILKUMAR *et al.*, 2006; YIN *et al.*, 2007).

Para o uso dessas estratégias foram criados diversos tipos de vetores, para a formação de estruturas em forma de grampo, que podem ser obtidas por uma região amplificada de um gene, posicionada sob o controle de um promotor, orientados de forma direta (sense) e reversa (antisense), intercaladas por um intron ou uma região espaçadora, que permita a formação de um loop (ARAGÃO *et al.*, 2013).

O mecanismo de RNAi envolve a ação de uma endonuclease RNase III, chamada DICER, que possui o papel importante de clivar moléculas de dsRNA, em siRNA (pequenos RNAs interferentes) e em miRNA (microRNA) (ANGOJI *et al.*, 2010).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 *Material vegetal*

Frutos imaturos da variedade “Sunrise Solo” (Figura 1 A) foram coletados de 90 a 120 dias após a polinização no BAG (Banco Ativo de Germoplasma) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizado em Cruz das Almas – BA, de acordo com Fitch *et al.* (1990).

### 4.2 *Desinfestação dos frutos e sementes*

Os procedimentos de laboratório foram executados na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília-DF, no Laboratório de Engenharia Genética Aplicada a Agricultura Tropical.

Os frutos foram enviados da Embrapa Mandioca e Fruticultura por sedex, e o quanto antes foram lavados superficialmente com sabão e água corrente e em seguida com hipoclorito de sódio comercial a 2% (NaClO), em câmara de fluxo laminar. Em seguida, o fruto foi flambado com álcool comercial e as sementes foram coletadas em um recipiente previamente autoclavado. As sementes foram submersas em solução de etanol 70% (v/v) durante cinco minutos, que foi retirada, e depois em solução de hipoclorito de sódio 2% por 25 minutos, seguido de três enxágües com água destilada autoclavada.

Após a desinfestação das sementes, com auxílio de lupa, pinça e bisturi e dentro da câmara de fluxo laminar, os embriões zigóticos (Figura 1 B) foram isolados das mesmas, em condições assépticas.

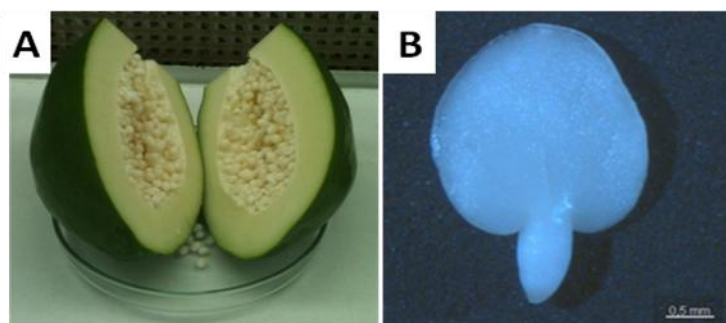


Figura 1: Estádios de desenvolvimento do fruto, sementes e embrião zigótico de mamão utilizado para indução de embriogênese somática: (A) fruto imaturo da cv. “Sunrise Solo” de mamão; (B) embrião zigótico imaturo isolado da semente.



### **4.3 Indução de Embriogênese somática**

Embriões zigóticos imaturos excisados das sementes foram inoculados em meio MS meia força (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) 10 mg/L, sacarose 6%, glutamina 400 mg/L, mio-inositol 50 mg/L, tiamina 0,4 mg/L, glicina 2 mg/L, ácido nicotínico 0,5 mg/L e piridoxina 5 mg/L, ágar 0,8% e pH 5,8 (GONSALVES, 1998) em placas de Petri. Os embriões zigóticos foram posicionados verticalmente, com o meristema apical voltado para cima e o meristema radicular imerso no meio. As placas foram mantidas no escuro a  $25 \pm 2$  °C por seis a oito semanas.

Embriões somáticos primários foram transferidos para membrana de nitrocelulose e foram esmagados com o auxílio de uma espátula. As membranas com o macerado de células embriogênicas foram inoculadas em placas com novos meios de indução, mantidas no escuro a  $25 \pm 2$  °C por seis a oito semanas e embriões somáticos secundários foram novamente esmagados e bombardeados após três a sete dias.

### **4.4 Indução de organogênese**

Embriões zigóticos imaturos isolados de sementes foram induzidos em meio suplementado com TDZ (Thidiazuron) foram utilizados para transformação genética via biobalística.

### **4.5 Transformação genética**

#### **4.5.1 Vetor**

O plasmídeo pAPRNAi2 contém o cassete de RNAi para os dois vírus, PMeV e PRSV, e o gene de seleção *bar*, que confere resistência ao herbicida glifosinato de amônio (GA), utilizado para selecionar as células transformadas (Figura 2).

Fragmentos de cerca de 400 pb dos genes que codificam para a capa protéica dos vírus PRSV e PMeV foram sintetizados na empresa Epoch Biotech. O cassete de interferência (PRSV-PMeV) foi transferido para o vetor pUCBar para adição do gene *bar*.

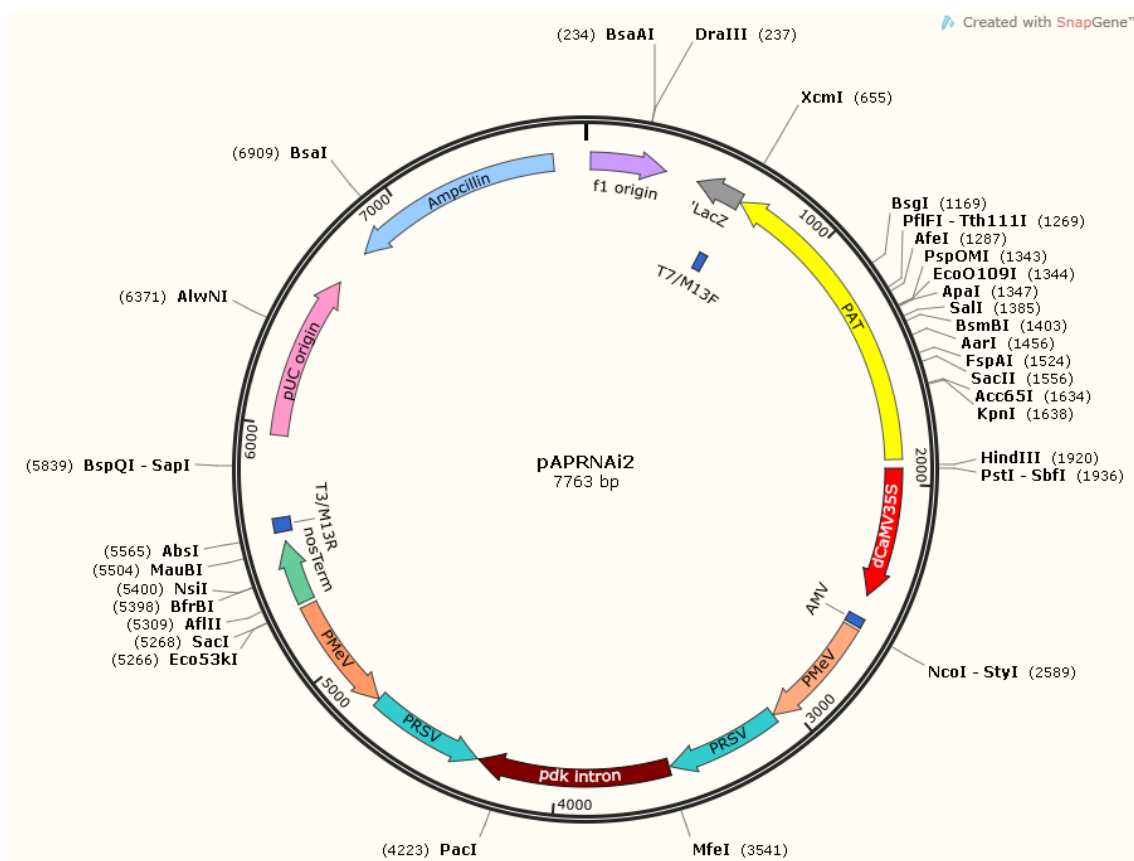


Figura 2: Representação esquemática do vetor pAPRNAi2 que contém as construções de RNAi para sequências específicas dos vírus PRSV (azul) e PMeV (laranja), referentes a fragmentos de ~400 pb que apresentam as mesmas sequencias de forma invertida e separadas pelo pdk intron para formar a estrutura de grampo. O cassette de RNAi está sob o controle do promotor CaMV35S dobrado. O gene bar (amarelo) confere resistência ao herbicida glifosinato e codifica para a enzima Phosphinotricina Acetil Transferase (PAT).

#### 4.5.2 Bombardeamento de massa embriogênica

Embriões somáticos secundários que foram novamente esmagados sobre membrana de nitrocelulose foram bombardeados após três a sete dias com o plasmídeo pAPRNAi2 (ARAGÃO *et al.*, 1996). Anteriormente, partículas de tungstênio W 100 (60 mg) foram pesadas e lavadas com etanol 70 % seguida por três lavagens com água destilada autoclavada. Após a lavagem, as micropartículas foram ressuspensas em solução estéril de glicerol 50% (1 mL). Para precipitação do plasmídeo nas micropartículas foram adicionados em sequência o DNA plasmidial pAPRNAi2 5 µL (1 mg/ml), cloreto de cálcio - CaCl<sub>2</sub> (2,5 M) 50 µL e espermidina (0,1 M) 20 µL à 50 µL de micropartículas de tungstênio (60 mg/ml), anteriormente sonificadas por 10 minutos e vortexadas na velocidade máxima por 1 min. A suspensão foi homogeneizada e mantida

sob baixa agitação no agitador do tipo Vórtex durante 10 min, centrifugada por 15 seg, e logo após o sobrenadante foi descartado. As partículas foram ressuspensas em etanol absoluto 150 µL, e o sobrenadante foi retirado após centrifugação por 15 segundos. O procedimento de lavagem foi repetido por três vezes. As partículas foram novamente ressuspensas em etanol absoluto 24 µL, e sonicadas por dois segundos, após o qual foram distribuídas no centro das membranas carreadoras em alíquotas de 3,2 µl. Os discos com as membranas carreadoras foram transferidos para uma placa de Petri com sílica, colocadas em um dessecador por 25 minutos para a secagem total do etanol.

Antes da transformação as membranas de nitrocelulose contendo o macerado de células embriogênicas foram transferidas para meio de bombardeamento, que consiste no meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com sacarose 3%, fitagel 0,7% e pH 5,8. Em cada placa foram dados dois tiros, com vácuo de 27 mm Hg, distância percorrida pelas partículas até o anteparo de 6 cm e uma pressão de gás Hélio de 1.200 PSI. Algumas placas não foram bombardeadas para representar o controle do experimento.

Após o bombardeamento, as membranas foram transferidas para meio de indução novo e mantidas no escuro a  $25 \pm 2$  °C por quatro a sete dias. Após esse período as membranas com material bombardeado e metade do controle foram transferidas para meio de indução contendo o agente seletivo glufosinato de amônio (GA) 5 mg/L. A outra metade do controle foi transferida para meio de indução sem GA, para acompanhar o desenvolvimento dos tecidos, tanto do controle com e sem seleção, como dos tecidos bombardeados.

#### *4.5.3 Bombardeamento de embriões zigóticos induzidos em TDZ*

Embriões zigóticos induzidos para organogênese foram posicionados nas placas de bombardeamento com o meristema apical voltado para cima, dispostos de forma a evitar o centro da placa de Petri ou a “região de morte. Os embriões foram bombardeados com o plasmídeo pAPRNAi2 nas mesmas condições descritas no item acima.

### *4.6 Regeneração de explantes transformados*

#### *4.6.1 De embriões somáticos (Maturação, Germinação e aclimatação)*

Após seis a oito semanas os embriões somáticos secundários resistentes ao glifosinato de amônio, foram transferidos diretamente para meio de maturação, que é idêntico ao meio de indução sem a presença de 2,4-D, mantendo a seleção com G.A 5mg/L por quatro semanas, em condições de luz a  $25 \pm 2$  °C (GONSALVES,1998).

Após esse período, os embriões somáticos foram para meio de germinação composto por sais MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), mio-inositol 100 mg/L, tiamina 0.4 mg/L, sacarose 3%, ágar 0,8% e pH 5.8 (FITCH, 1993), sem o agente seletivo. Os embriões somáticos que germinaram no meio de germinação formaram plântulas in vitro, que foram aclimatadas em casa de vegetação, em substrato (solo e vermiculite, na proporção de 1:1), inicialmente cobertas com um saco plástico, que foi retirado após uma semana (ARAGÃO *et al.*, 1996).

#### *4.6.2 De brotos induzidos em TDZ*

Duas a três semanas após o bombardeamento os embriões zigóticos foram transferidos para meio de germinação. Brotos resistentes foram subcultivados em meio de brotação com herbicida GA com concentração variando de forma crescente ou decrescente, com concentrações de 2,5; 5 e 10 mg/L.

#### *4.7 Ensaio de fluxo lateral da proteína PAT*

Para confirmar a natureza transgênica dos brotos resistentes ao GA foram feitas análises para a detecção da proteína PAT (fosfinotricina acetil transferase), produto da expressão do gene *bar*, através de kits de “Strip-Tests” (teste da tirinha) ou imunoensaios de fluxo lateral (Lateral Flow Strip). Amostras dos tecidos transformados foram macerados em tubos de centrífuga do tipo Eppendorfs na presença de solução tampão comercial (PBS), diluída 10X com água destilada. Após obter o macerado, a tirinha foi introduzida no líquido por 5 a 15 min.

No teste da tirinha a banda superior é um controle positivo para checagem da validade do teste, esta é sempre positiva quando o teste está viável, e a banda inferior é referente à presença detectada da proteína PAT, que acende apenas no material onde o gene *bar* foi integrado e está havendo a expressão desse gene nas duas marcações. (Conceição *et. al* 2006)

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Embriogênese somática

#### 5.1.1 Indução de embriogênese somática

Após quatro a seis semanas de cultivo em meio contendo 2,4-D (10 mg/L), embriões zigóticos imaturos formaram embriões somáticos primários na região do meristema apical (Figura 3 A). Na figura 3 A é possível observar embriões somáticos globulares de coloração amarelo-clara induzidos no meristema apical, enquanto que no eixo do embrião houve proliferação de calos friáveis. Com o aumento do período de cultura esses embriões globulares desenvolveram-se em embriões no estágio de torpedo (Figura 3 B), tendo sido coletados e macerados nessa fase. A indução de embriogênese somática após a maceração de embriões somáticos primários resultou, após seis a oito semanas, na proliferação de embriões somáticos secundários (Figura 3 C).



Figura 3: Indução de embriogênese somática em embrião zigótico imaturo: (A) formação de embriões somáticos globulares no meristema apical, após quatro a seis semanas de indução em meio suplementado com 2,4-D (10 mg/L); (B) embriões somáticos no estágio de torpedo, após oito semanas de cultivo em meio de indução; (C) proliferação de embriões somáticos secundários em macerado de embriões somáticos primários após oito semanas de cultivo.

O macerado de embriões somáticos primários originou embriões somáticos secundários em distintos estádios de desenvolvimento como pode ser observado na Figura 4. Embriões somáticos globulares podem ser observados na Figura 4 B, torpedos nas figuras 4 C e D, coração na Figura 4 E e cotiledonar na Figura 4 F.

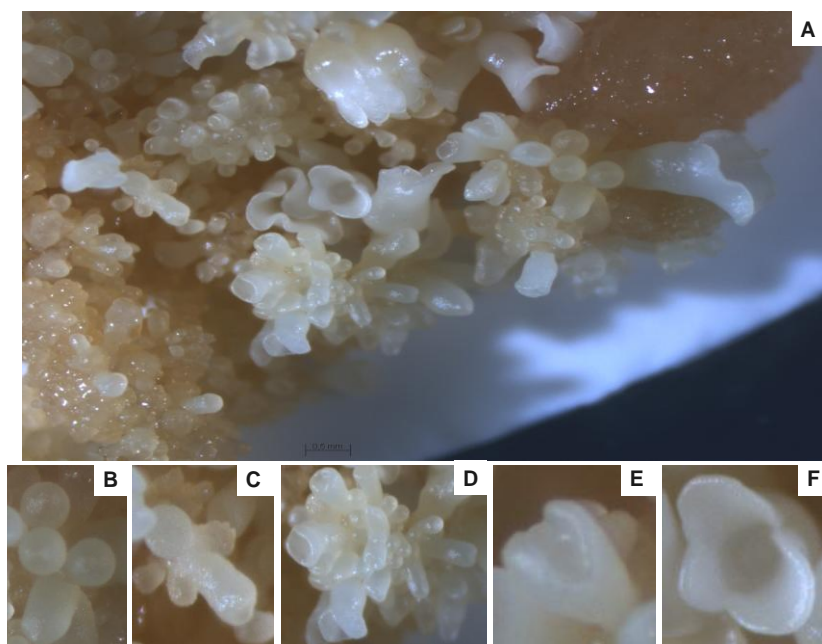


Figura 4: Indução de embriogênese somática secundária a partir de embriões somáticos primários macerados da cv. Sunrise Solo: (A) intensa proliferação de embriões somáticos secundários no macerado, (B) embrião somático globular, (C e D) Torpedo, (E) Coração, (F) Cotiledonar.

A resposta à indução de embriogênese somática na cultivar Sunrise Solo deu-se após quatro semanas, com formação de embriões somáticos globulares diretamente no meristema apical do embrião zigótico imaturo (Figura 3 A), que posteriormente se desenvolveram em torpedos, e após seis a oito semanas apresentaram quantidade suficiente para a maceração e para o processo de biobalística. Nossos resultados foram similares aos obtidos por Fitch *et al.* (1990), Cai *et al.* (1999) e Abreu *et al.* (2011) que obtiveram embriões somáticos a partir de embriões zigóticos induzidos com 2,4-D 10 mg/L após quatro a cinco semanas, comprovando a alta capacidade de resposta morfogênica da região meristemática desses explantes de mamão.

Enquanto que Cheng *et al.* (1996), Ramaswamy *et al.* (2010), Malabadi *et al.* (2011) relataram a formação de embriões somáticos em embriões zigóticos induzidos em concentrações mais baixas de 2,4-D, em que 2 mg/L foram suficientes para a indução dos calos embriogênicos.

Após sucessivas macerações de embriões somáticos induzidos, foi observada uma redução na capacidade proliferativa e regenerativa do material que apresentou oxidação com maior formação de calos friáveis e hídricos (Figuras 5 A e B). Para evitar a degeneração do material, assim como, problemas de variação somaclonal induzidas pela alta concentração de 2,4-D, o número de macerações foi reduzida para no máximo duas,

assim como no trabalho desenvolvido por Cai e colaboradores (1999), onde apenas macerados embriogênicos novos foram usados para a transformação genética.

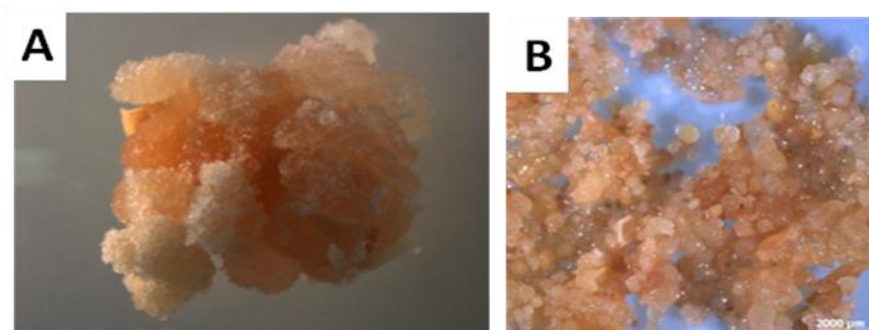


Figura 5: Efeito de sucessivas macerações para indução de embriogênese somática secundária na presença de 2,4-D: (A) calos friáveis não embriogênicos; (B) calos oxidados sem resposta embriogênica.

#### 5.1.2 *Regeneração de embriões somáticos após o bombardeamento*

Macerados embriogênicos bombardeados e induzidos na presença de glifosinato de amônio (5 mg/L) por seis a oito semanas, formaram embriões somáticos secundários resistentes ao herbicida, que foram transferidos para meio de maturação ao atingirem o estágio cotiledonar e uma coloração amarelo-clara (Figuras 6 A e B).

Os embriões somáticos resistentes ao herbicida foram subcultivados em meio de maturação e germinação na presença do agente seletivo GA 5 mg/L, e após várias repicagens a seleção foi retirada para favorecer a germinação dos embriões somáticos em plântulas. Os embriões somáticos que permaneceram em meio de maturação e germinação com seleção paralisaram e escureceram, devido à presença do GA. O efeito deletério do herbicida na germinação dos embriões somáticos também foi observado por Cai *et al.* (1999). A retirada da seleção na fase de maturação em diante, possibilitou que os explantes alongassem e ficassem esverdeados (Figuras 6 C e D), prontos para serem transferidos para meio de germinação, onde foi possível obter plântulas, que foram posteriormente transferidas para a casa de vegetação (Figuras 6 E e F).



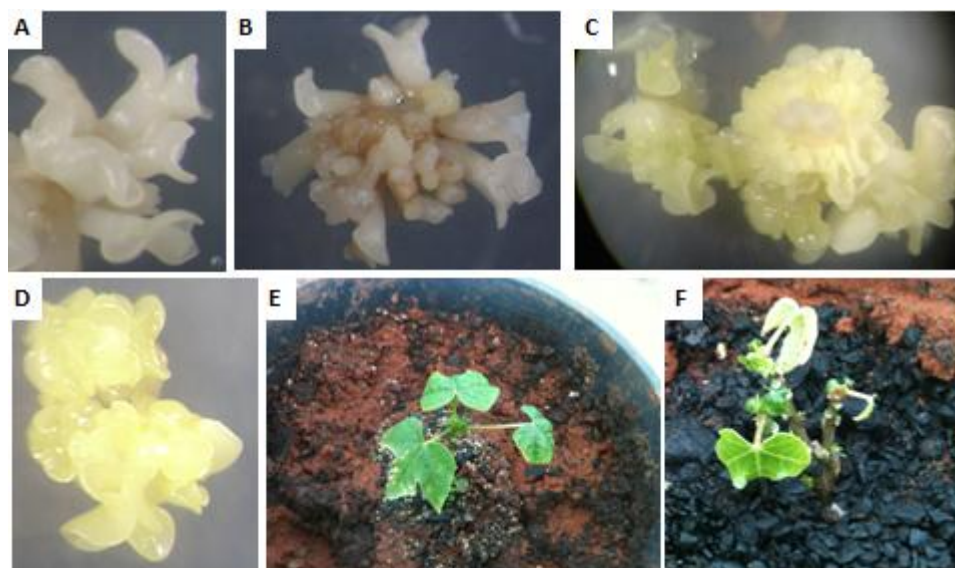


Figura 6: Maturação e germinação de embriões somáticos da cv. Sunrise Solo: (A e B) embriões somáticos secundários no estágio cotiledonar após seis a oito semanas de cultivo em meio contendo G.A, (C e D) embriões somáticos secundários com coloração esverdeada em meio de maturação sem G.A, (E e F) plantas aclimatadas em casa de vegetação.

A desvantagem de retirar a seleção durante o processo de germinação dos embriões somáticos obtidos se dá pelo aumento na obtenção de escapes, ou favorecimento do desenvolvimento de embriões somáticos quiméricos, por permitir que células não transformadas se mantenham por não existir a pressão de seleção (CAI, *et al.*, 1999).

Cinco plantas, denominadas de 2, 4, 5A, 5B e 8 foram regeneradas e aclimatadas em casa de vegetação e suas folhas foram utilizadas para imunoensaios de fluxo lateral (Figura 7). Das plantas testadas, três foram negativas (4, 5A e 8), e duas apresentaram resultados positivos (2 e 5B). Resultados diferentes foram obtidos para folhas da planta 5B (Figura 7), que foi considerada de natureza quimérica, ou seja, que possui dois ou mais tecidos diferentes geneticamente que se desenvolveram de forma adjacente como parte da planta.





Figura 7: Imunoensaio de fluxo lateral das plantas regeneradas e aclimatadas, obtidas por embriogênese somática e por transformação via biobalística. As plantas 4, 5A e 8 apresentaram resultado negativo, e a planta 2 e 5B apresentaram resultado positivo, sendo que a planta 5B foi considerada uma planta quimérica por apresentar folhas com resultados diferentes.

## 5.2 Organogênese – Indução e regeneração

### 5.2.1 Indução de organogênese

Embriões zigóticos imaturos da cv. Sunrise induzidos em meio suplementado com TDZ (1 mg/L) por 10 dias iniciaram resposta morfogênica para formação de gemas adventícias no meristema apical (Figura 8 A).

### 5.2.2 Regeneração de brotos após o bombardeamento

Explantos após serem bombardeados e cultivados na presença de TDZ e glifosinato de amônio produziram gemas resistentes ao herbicida numa frequência média de 50% (Figura 8 B). Na figura 8 C pode ser observada a brotação das gemas no controle de regeneração, onde foi acompanhado o efeito morfogênico do TDZ nos explantes que não passaram pela transformação genética.

Os brotos resistentes em elongação foram sucessivamente isolados e subcultivados (Figura 8 D). Em testes de imunoensaios de fluxo lateral (teste da tirinha) vários brotos resistentes apresentaram a expressão da proteína fosfo acetil transferase (PAT), comprovando sua natureza transgênica (Figura 8 E e 9). No teste da tirinha a banda superior é um controle positivo para checagem da validade do teste, esta é sempre positiva quando o teste está viável, e a banda inferior é referente à presença detectada da proteína PAT, que aparece apenas no material onde o gene *bar* foi integrado e está havendo a expressão desse gene nas duas marcações.

Em testes realizados com explantes provenientes do mesmo broto foram observados resultados diferentes (Figura 9), devido ao fato de células não transformadas crescerem juntamente com as transformadas, que podem filtrar o agente seletivo permitindo o desenvolvimento de células, consideradas como um escape, pois apesar de não serem resistentes ao herbicida desenvolveram-se.

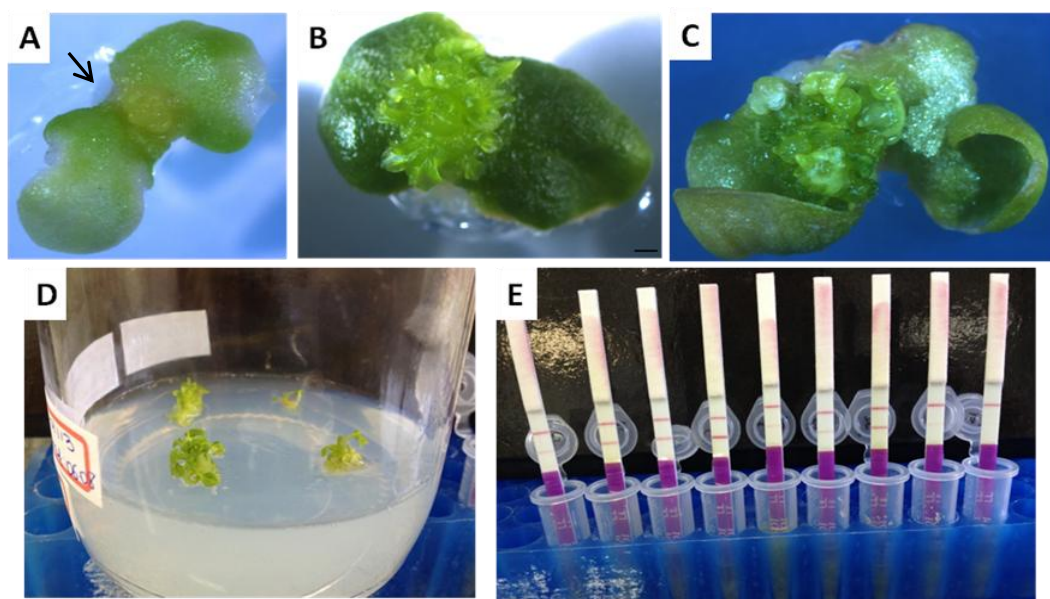


Figura 8: Indução de organogênese e regeneração de brotos transgênicos a partir de embrião zigótico imaturo da cv. Sunrise Solo: (A) embrião zigótico induzido para organogênese em meio com TDZ no início da morfogênese no meristema apical (seta); (B) embrião zigótico do tratamento controle de regeneração com multibrotações no meristema apical em meio sem a presença do agente seletivo GA; (C) embrião zigótico com múltiplas gemas em proliferação resistentes ao GA; (D) brotos resistentes ao GA alongando em meio de brotação; (E) Análise da expressão da enzima PAT de brotos resistentes ao GA.



Figura 9: Detalhe do Imunoensaio de fluxo lateral para a proteína PAT de brotos resistentes ao GA subcultivados em meio de brotação. Brotos diferentes originados de um mesmo explante definidos como A, B, C, D, E, G, H, I, J, L, X e +1; Brotos A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B, C, C<sub>2.1</sub>, C<sub>2.3</sub>, C<sub>0</sub>, D, G<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, L e X apresentaram resultado positivo, com duas bandas.

Neste trabalho, os explantes de mamão foram induzidos em TDZ por dez dias antes do bombardeamento, que foram eficientes para a indução e proliferação de gemas. No entanto, nos últimos experimentos a redução do período de indução no TDZ está sendo priorizada para promover a elongação dos brotos num período mais curto, para favorecer o enraizamento dos mesmos. No trabalho de Sousa (2013) foi demonstrado por microscopia eletrônica de varredura a eficiência da indução com TDZ, com formação inicial de gemas no meristema de embriões zigóticos de mamona (*Ricinus communis* L.) a partir do quarto dia de indução, tendo havido maior desenvolvimento após oito dias.

A seleção dos explantes transformados foi realizada em concentrações crescentes ou decrescentes de GA (2,5; 5 e 10 mg/L) nos diferentes meios de indução, germinação e brotação. O sistema de seleção mais adequado consistiu em iniciar com a concentração mais alta (10 mg/L) que foi sendo reduzida gradativamente (5 mg/L para 2,5 mg/L), pois permitiu uma melhor seleção dos explantes iniciais para formação de brotos.

As contaminações foram controladas com a adição dos antibióticos cefotaxima (100 mg/L) e timentin (50 mg/L), e fungicida Benlate (0,05 mg/L) ao longo de todo o processo de organogênese.

## 6. CONCLUSÕES

- 1) Os protocolos de indução de embriogênese somática, maturação, germinação e enraizamento *in vitro* do mamoeiro, estabelecidos neste trabalho foram considerados reprodutíveis e eficientes.
- 2) Região meristemática de explantes de mamão apresentaram alta capacidade de resposta morfogênica.
- 3) A metodologia desenvolvida de transformação genética por biobalística de embriões zigóticos imaturos induzidos para organogênese do mamoeiro (*Carica papaya* L.) tem-se mostrado eficiente, com alta formação de gemas, e de brotos transformados, além de ser inédita na literatura.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, E. F. M.; TINOCO, M. L. P.; JESUS, C. C.; OLIVEIRA, H. C.; RAMALHO, C. S.; ANDRADE, E. C.; VIANNA, G. R.; ARAGAO, F. J. L. In: Simpósio do Papaya Brasileiro, 5, 2011, Porto Seguro. Inovação e sustentabilidade: anais. Porto Seguro: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011.
- AMMIRATO, P. V. Embryogenesis. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Ed.). Handbook of Plant Cell Culture: techniques for propagation and breeding. New York: MacMillan, v.1, p. 82-123, 1983.
- ANGOJI, S.A.; HEDAYATI, S.S.; HOSEIN poor R.; SAMAD poor S.; SHIRAVI, S.; MADANI, S. Application of RNA interference in plants. Plant Omics Journal, 3: 77-85, 2010.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA 2013. Santa Cruz do Sul: Ed. Gazeta Santa Cruz, p.64-67, 2013.
- ARAGÃO, F.J.L.; GROSSI DE SÁ, M. F.; DAVEY, M. R.; BRASILEIRO, A. C. M.; FARIA, J. C.; RECH, E. L. Factors influencing transient gene expression in bean (*Phaseolus vulgaris*) using an electrical particle acceleration device. Plant Cell Reports, New York, v.2, p.483-490, 1993.
- ARAGÃO, F.J.L.; BARROS, L. M. G.; BRASILEIRO, A. C. M.; RIBEIRO, S. G.; SMITH, F. D.; SANFORD, J. C.; FARIA, J. C.; RECH, E. L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. Theor. appl. Genet. v.93, p.142–150. 1996.
- ARAGÃO, F.J.L.; BRASILEIRO, A. C. M. Introdução de genes em células vegetais mediada pelo processo biobalístico. In: CID. L.P.B. Cultivo in vitro de plantas . Brasília, DF: Embrapa InformaçãoTecnológica, p. 247-274, 2010.
- ARAGÃO, F. J. L.; IBRAHIM, A. B.; TINOCO, M. L. P. RNA interferente. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO. Ômicas 360º: aplicações e estratégias para melhoramento de plantas. Visconde do Rio Branco: Suprema, P. 69-94, 2013.
- BARBOSA, F.R.; PAGUIO, D.R. Vírus da Mancha Anelar do Mamoeiro: Incidência e Efeito na produção do mamoeiro. Fitopatologia Brasileira 7:365-373, 1982.
- BOMFIM, K.; FARIAS, J. C.; NOGUEIRA, E. O. P. L.; MENDES, E. A.; ARAGÃO, F. J. L. RNA-mediated resistance to bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolusvulgaris*).Mol Plant Microbe Interact., 20:717-726, 2007.

BONGA, J. M. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity, and rejuvenation. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Ed.). Tissue Culture in Forestry. Dordrecht: Martinus-Nijhoff: Dr W. Junk, p. 387-412, 1982.

CAI, W.; GONSALVES, C.; TENNANT, P.; FERMIN, G.; SOUZA JR., M. T.; SARINDU, N.; JAN, F.; ZHU, H.; GONSALVES, D. A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. In vitro Cell Dev. Biol. - Plant, v.35, p. 61-69, 1999.

CHENG, Y. H.; YANG, J. S.; YEH, S. D. Efficient transformation of papaya by *Agrobacterium* following liquid-phase wounding of embryogenic tissues with caborundum. Plant Cell reports, Berlin, n. 16, p.127-132, 1996.

CORREA, F.J.F.; FRANCO, B.J.D.C.; WATANABE, H.S.; SAKAY, M.Y.; YAMASHITA, E.M.A. Estudo preliminar sobre exsudação do látex do mamoeiro - Teixeira de Freitas. In: Anais, 2, Simpósio Brasileiro da Cultura do Mamoeiro. p. 409-428, 1988.

COSTA, A.S.; CARVALHO, A.M.; KAMADA, S. Constatado o mosaico do mamoeiro em São Paulo. O Agrônômico 21:38-43, 1969.

DANTAS, J. L. L.; MORALES, C. F. G. Melhoramento genético do mamoeiro. In: MENDES, L.G.; DANTAS, J.L.L.; MORALES, C.F.G. (Ed.). Mamão no Brasil. Cruz das Almas: UFBA/Embrapa-CNPMF, p 121-143, 1996.

DOUGHERTY, W.G.; PARKS, T.D. Transgenes and gene suppression: telling us something new. Current Opinion in Cell Biology 7:399-405, 1995.

FITCH, M.M.M.; MANSHARDT, R.M. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (*Carica papaya* L.). Plant Cell Report, v.9, p.320-324, 1990.

FITCH, M. M. M. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. Plant Cell Tissue Organ Cult. 32:205-212, 1993.

FITCH, M. M. M.; MANSHARDT, R. M.; GONSALVES, D., SLIGHTOM J. L., SANFORD, J. C. Stable transformation of papaya via microprojectile bombardment. Plant Cell Reports, n .9, p.189-194, 1990.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION –FAO. Fao Statistical Yearbook 2013- World Food and Agriculture. Disponível em <[www.fao.org](http://www.fao.org)>. Acesso em 04/12/2013.

GONSALVES, D. Control of *Papaya ringspot virus* in papaya: A case study. Annual Review Phytopathology 36:415- 437. 1998.

GONSALVES, D., C. GONSALVES, S. FERREIRA, K. PITZ, M. FITCH, R. MANSHARDT, AND J. SLIGHTOM. Transgenic virus resistant papaya: From hope to reality for controlling papaya ringspot virus in Hawaii. APSnet feature story for July, 2004.

GONSALVES, D., S. TRIPATHI, J. B. CARR, AND J. Y. SUZUKI. Papaya Ringspot virus. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2010-1004-01, 2010

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/cgi-bin/prtabl>>. Acesso em: 04/12/2013.

KITAJIMA, E.W.; RODRIGUES, C.; SILVEIRA, J.; ALVES, F.; VENTURA, J.A.; ARAGÃO, F.J.L.; OLIVEIRA, L.H.R. Association of isometric virus-like particles, restricted to laticifers, with “meleira” (“sticky disease”) of papaya (*Carica papaya*). Fitopatologia Brasileira 8:118-122, 1993.

KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; WU, R.; SANFORD, J. C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. Nature, London, v. 327, p. 70-73, 1987.

KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; WU, R.; SANFORD, J. C. Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high-velocity microprojectiles. Bio/Technology, New York, v. 6, p. 559-563, 1988.

LEMOS, E. E. P. Organogênese. In: CID. L.P.B. Cultivo in vitro de plantas. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 102-127, 2010.

LIMA, J.A.A.; GOMES, M.N.S. Identificação de *Papaya ringspot virus* no Ceará. Fitossanidade 1:56-59, 1975.

LIMA, R.C.A.; LIMA, J.A.A.; SOUZA Jr., M.T.; PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G.P. Etiologia e estratégias de controle de viroses do mamoeiro no Brasil. Fitopatologia Brasileira 26: 689- 702, 2001.

MAGDALITA, P.M.; PERSLEY, D.M.; GODWIN, I.D.; DREW, R.A.; ADKIS, S.W. Screening *Carica papaya* x *C. cauliflora* hybrids for resistance to *Papaya ringspot virus*-type-P. Plant Pathology 46:837-841, 1997.

MALABADI, R.B.; KUMAR, S.V.; MULGUND, G.S.; NATARAJA, K. Induction of somatic embryogenesis in Papaya (*Carica papaya*). Research in Biotechnology, 2 (5): 40-55, 2011.

MANICA, I. Fruticultura Tropical 3. Mamão. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 276, 1982.

MANICA, I. Cultivares e melhoramento do mamoeiro. In: MENDES, L.G.; DANTAS, J.L.L.; MORALES, C.F.G. (Ed.). Mamão no Brasil. Cruz das Almas: UFBA/Embrapa-CNPMF, p 93-120, 1996.

- MARIN, S.L.D.; SILVA, J.G.F. Aspectos econômicos e mercados para a cultura do mamoeiro do grupo Solo na região Norte do Espírito Santo, in 1995. In: Mendes, L.G., Dantas, J.L.L. & Morales, C.F.G. (eds.). Mamão no Brasil. Brasil: Cruz das Almas, p.7-20, 1996.
- MING, R.; HOU, S.; FENG, Y.; YU, Q.; DIONNE-LAPORTE, A.; SAW, J.H *et al.* The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). Nature 452: 991-996, 2008.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, v.15, p.437-497, 1962.
- MURAYAMA, S.J. Fruticultura. 2ed. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1986.
- NAKAGAWA, J., TAKAYAMA, Y.; SUZUKAMA, Y. Exudação de látex pelo mamoeiro. Estudo de Ocorrência em Teixeira de Freitas, BA. In: Anais, 9º, Congresso Brasileiro de Fruticultura, Campinas, SP. p.555- 559, 1987.
- NAKASONE, H. Y. A situação do vírus do mamão no Havaí.: In: RUGGIERO, C.; Simpósio Brasileiro Sobre a Cultura do Mamoeiro, 1º , Jaboticabal, p. 199-209, 1980.
- OLIVEIRA, R. P.; DANTAS, J. L. L.; ALMEIDA, E. P.; NICKEL, O.; VILARINHOS, A. D.; MORALES, C. F. G. Uso da biotecnologia no melhoramento genético e propagação do mamoeiro. In: MENDES, L.G.; DANTAS, J.L.L.; MORALES, C.F.G. (Ed.). Mamão no Brasil. Cruz das Almas: UFBA/Embrapa-CNPMF, p 159-172, 1996.
- OSSOWKI, S. SCHWAB, R.; WEIGEL, D. Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. Then Plant Journal, 53: 674-690, 2008.
- PASTERNAK, T.; PRINSEN, E.; AYAYDIN, F.; MISKOLCZI, P.; POTTERS, G.; ASARD, H.; VAN ONCKELEN, H.; DUDITS, D.; FEHER, A. The role of auxin, pH and stress in stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Plant Physiology, Bethesda, v. 129, p. 1807-1819, 2002.
- PEREIRA, F.A.; CARNEIRO, M.R.; ANDRADE, L.M. cultura do mamão/ Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. 3. ed. rev. ampl. Brasília, DF: Embrapa Informação e tecnologia, 2009. 119 p. (Coleção Plantar,65).
- PRINS, M. Broad virus resistance in transgenic plants. Trends in Biotechnology, v.21, p.373-375, 2003.
- PURCIFULL, D.E.; EDWARDSON, J.; HIEBERT, E.; GONSALVES, D. *Papaya ringspot virus*. Descriptions of Plant Viruses. Kew Surrey: CMI/AAB, No. 292, 1984a.



- RAMASWAMY, A.; PHAP, P.D.; SOORIANATHASUNDARAM, K.; KUMAR, N. Somatic Embryogenesis in *Carica papaya* through Zygotic Embryo Derived Callus Culture, p. 201-208, 2010.
- RECH, E.L.; VIANNA, G.R.; ARAGÃO, F.J.L. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nature Protocols*, v.3, p.410–418, 2008.
- REZENDE, J.A.M.; FANCELLI, M.I. Doenças do mamoeiro (*Carica papaya* L.). In: Kimati, H., Amorim, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A. & Rezende, J.A.M. (Eds.) *Manual de Fitopatologia. Volume 2: Doenças das plantas cultivadas*. p. 486-496, 1997.
- RITZENTHALER, C. Resistance to plants viruses: old issue, new answers? *Current Opinion in Biotechnology*, v.16, p.118-122. 2005.
- RODRIGUES, C.H.; ALVES, F.L.; MARIN, S.L.D.; MAFFIA, L.A.; VENTURA, J.A.; GUTIERREZ, A.S.D. Meleira do mamoeiro no estado do Espírito Santo: enfoque fitopatológico. Linhares: EMCAPA, In: *Selecta de Trabalhos sobre a meleira do mamoeiro*, 1989a.
- RODRIGUES, C.H.; VENTURA, J.A.; MAFFIA, L.A. Distribuição e transmissão da meleira em pomares de mamão no Espírito Santo. *Fitopatologia Brasileira* 14:118. 1989b. (Resumo)
- SANFORD, J. C.; KLEIN, T.M.; WOLF, E.D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells tissues using a particle bombardment process. *Part. Sci. Techn.*, 5: 27-37, 1987.
- SINGH, N. D.; SAHOO, L.; SARIN, N. B.; JAIWAL, P. K. The effect of TDZ on organogenesis and somatic embryogenesis in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Mill.). *Plant Science, Limerick*, v. 164, p. 341-347, 2003.
- SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, [Cambridge], v. 11, p. 118-131, 1957.
- SMITH, F. D.; HARPENDING, P. R.; SANFORD, J. C. Biobalistic transformation of prokaryotes: factors that affect biolistic transformation of very small cells. *Journal of General Microbiology*, London, v. 138, p. 239-248, 1992.
- SOUZA, N. L. Desenvolvimento de sistemas para transformação genética de mamona (*Ricinus communis* L.) – as bases para o silenciamento da ricina.(2013). Universidade de Brasília, DF, 2013. p. 64.
- SUNILKUMAR, G.; CAMPBELL, L. M.; PUCKHABER, L.; STIPANOVIC, R. D.; RATHORE, K. S. Engineering cottonseed for use in human nutrition by tissue-specific reduction of toxic gossypol.PNAS., 103: 18054-18059, 2006.

- VENTURA, J. A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J. S.; ANDRADE, J. S. Meleira do Mamoeiro: Etiologia, Sintomas e Epidemiologia. In: MARTINS, D. S. Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno. Vitória, ES: Incaper, P. 267-289, 2003.
- VILARINHOS, A. D.; NICKEL, O.; OLIVEIRA, R. P.; DANTAS, J. L. L. Resistência não convencional a viroses: Utilização do gene da capa protéica do vírus da mancha anelar do mamão (PRV). In: MENDES, L.G.; DANTAS, J.L.L.; MORALES, C.F.G. (Ed.). Mamão no Brasil. Cruz das Almas: UFBA/Embrapa-CNPMF, p 173-181, 1996.
- YEH, S.D.; GONSALVES, D. Practices and perspective of control of *Papaya ringspot virus* by cross protection. *Advances in Disease Vector Research* 10:237-257, 1994.
- YIE, Y.; TIEN, P. Controlling mosaic virus diseases under field conditions by using multiple-gene strategies. In: Hadidi, A., Khetarpal, R.K. & Koganezawa, H. (Eds.). *Plant Virus Disease Control*. St. Paul: APS Press, p.129-141, 1998.
- YIN, D.; DENG, S.; ZHAN, K.; CUI, D. High-oleic peanut oils produced by hprna-mediated gene silencing of oleatedesaturase. *Plant Mol Biol Rep.*; 25:154-163, 2007.
- WANG, M. B.; ABBOTT, D. C.; WATERHOUSE, P. M. A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus. *Mol. PlantPathol.*, 6: 347-356, 2000.
- ZAMBOLIM, E.M. Identification and partial characterization of Papaya “meleira” virus. *Virus: Review & Research* 11:198, 2000. (Abstract).
- ZAMBOLIM, E.M.; BARROS, D.R.; MATSUOKA, K.; KUNEIDA, S.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. Purification and partial characterization of Papaya “meleira” virus. *Fitopatologia Brasileira* 33:442, 2000. (Resumo).
- ZIMMERMANN, M.J. Embriogênese somática. In: CID. L.P.B. *Cultivo in vitro de plantas*. Brasília, DF: Embrapa InformaçãoTecnológica, p. 67-101, 2010.